

令和元年6月14日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09840

研究課題名(和文) RNAiスクリーニングによるT細胞性急性リンパ性白血病の創薬標的遺伝子の同定

研究課題名(英文) Pooled shRNA screening for novel potential drug targets in T-ALL

研究代表者

宮城 聡 (Miyagi, Satoru)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：20400997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、T細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)の治療のための創薬の標的となる遺伝子を同定する事を目的として、T-ALLのモデルとなる培養細胞株及びに正常繊維芽細胞を用いてRNAiスクリーニング(一度に数千遺伝子の機能抑制の細胞増殖に対する効果を評価できる実験系)を行い、T-ALL細胞株でのみ細胞増殖に重要な役割を果す3遺伝子(METTL18、SHPRH、HDAC6)を同定した。特に、METTL18は、その高発現細胞ほど機能抑制に対する感受性が高いことから、T-ALL細胞の重要な増殖制御因子であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性リンパ性白血病は予後不良の白血病であり、長期生存率が20-40%と低く、細胞障害性の少ない分子標的薬の開発が急務である。本研究では、RNAiスクリーニングを行い、T細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)細胞の増殖に必須の遺伝子群(METTL18、SHPRH、HDAC6)を同定した。METTL18は、基質が同定されないものの、その構造からメチル化酵素であると想定されており、この酵素活性を指標とした低分子阻害剤の開発が可能である。従って、METTL18はT-ALLに対する分子標的薬の開発シーズとなる。

研究成果の概要(英文)：Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a disease with poor survival, therefore, development of molecular target drugs is awaited to improve the prognosis of ALL patients.

In this study, I used a short hairpin RNA (shRNA) library against chromatin modifiers, which play a pivotal role in normal hematopoiesis and leukemogenesis, to screen for novel potential drug targets in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). As a counter-screen for general toxicity of shRNAs, we used normal human fibroblast cells. One of the best candidate drug targets identified in these screens was METTL18, which is supposed to be an uncharacterized methyl-transferase. Depletion of METTL18 impairs growth of human T-ALL cell lines, but not normal cell, in vitro in dose-dependent manner and we observed the correlation between the expression level of METTL18 and cell growth rate in T-ALL lines, indicating METTL18 is an important regulator of T-ALL cells growth and is an ideal drug-target in T-ALL.

研究分野：血液学

キーワード：T細胞性急性リンパ性白血病 クロマチンタンパク質 shRNA スクリーン 創薬標的

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

クロマチンタンパク質を介した遺伝子発現制御は正常造血の制御に重要な役割を果たす。さらに、その遺伝子変異に伴う機能異常や発現異常は様々な白血病の発症や進行に影響を及ぼす。一方で、野生型クロマチンタンパク質の機能も白血病の進行に重要であり、近年、急性骨髄性白血病ではこれらを標的とした分子創薬が進められている。

これまで申請者は、急性骨髄性白血病 (AML) において RNAi スクリーニングを行い、新規の創薬標的遺伝子として JMJD1C 及びに SMARCA4 を同定した (Sroczyńska et al, Blood, 2014)。特に、SMARCA4 に関しては、その重要な機能ドメインであるプロモドメインを標的とした低分子阻害剤が AML の増殖を *in vivo* 及びに *in vitro* において抑制する事も見出した (Cruickshank et al., PLoS ONE, 2015)。これらの結果は、SMARCA4 阻害剤の AML 治療薬としての可能性を示唆している。本研究では、これらの経験を生かし、T-ALL においてスクリーニングを行い、創薬標的遺伝子を同定する。このような shRNA によるスクリーニングは AML において先行研究がなされているが、T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) に関しては報告がない。

## 2. 研究の目的

急性リンパ性白血病は予後不良の白血病であり、長期生存率が 20-40% と低く、細胞障害性の少ない分子標的薬の開発が急務である。

本研究では、クロマチンタンパク質に対する shRNA ライブラリーを用いた RNAi スクリーニングを行い、T-ALL における分子標的薬のシーズとなる遺伝子群を同定する。また、得られた因子に関しては生化学的な解析を行い、創薬の基盤となる情報を収集する。

## 3. 研究の方法

### (1) RNAi スクリーニング

2 種類の T-ALL 細胞株 (Jurkat, T-ALL1)、コントロールとして正常線維芽細胞 (BJhTERT) を用いて shRNA スクリーニングを行う。shRNA ライブラリーはレンチウイルスベクターである pLKO-Puro を用いて作成されており、クロマチンタンパク質をコードする約 300 遺伝子を標的とした約 1000 クローンから構成されている。100 万個の各細胞を感染効率が 20% 程度となるように shRNA ライブラリーをコードするレンチウイルスで感染後、ピューロマイシンで選択する (この条件でレンチウイルスのインテグレーションは細胞あたり約 1 copy であり、ライブラリーの coverage は 100 倍程度となる)。この細胞の一部を培養 0 日のサンプルとして回収し、残りの細胞を培養し培養 7 日と 10 日に回収する。これらの細胞よりゲノム DNA を調整し、shRNA 配列をシークエンスプライマー及びにバーコード配列を付加したプライマーを用いた PCR により増幅しシークエンスライブラリーを作成し、これを次世代シークエンサーに供し、各々の shRNA 配列の含量を定量する。このデータを基に培養 0 日に対して培養 7 日と 10 日で BJhTERT の増殖に影響を与えず、T-ALL 細胞株特異的に減少する shRNA (すなわち、ノックダウンに伴い T-ALL 細胞の増殖を抑制する遺伝子) をリストアップする。

### (2) RNAi スクリーニングの検証

(1) で得られた候補遺伝子群に関しては、ターゲット配列の異なる複数の shRNA を用いたノックダウンを行い、その増殖抑制効果を個別に検証する。

### (3) Crispr 法により遺伝子破壊株の樹立

(2) までのスクリーニングを通過した遺伝子に関しては、shRNA のオフターゲット効果の可能性を否定するため、Crispr 法により遺伝子破壊株を樹立し、その増殖能を検証する。Crispr 法にはベクターとして、遺伝子導入された細胞を GFP によりマーキングできる pX458 を用い、METTL18 遺伝子の 5' 上流領域及びに 3' 下流領域に設計した guideRNA 配列を挿入した。この 2 種類のコンストラクトを Jurkat 及びに T-ALL1 細胞にエレクトロポレーション法により一過的に導入し、24 時間後に FACS ARIA II によりシングルセルソーティングを行い、クローン化した。得られたクローンは PCR 及びにウエスタンブロットにより遺伝子破壊を確認した。

## 4. 研究成果

T-ALL における創薬標的を同定するため、2 種類の T-ALL 細胞株 (Jurkat, T-ALL1) と BJhTERT を用いて RNAi スクリーニングを行い、培養 0 日に対して培養 7 日と 10 日で減少する shRNA (すなわち、これら shRNA の標的遺伝子は細胞の増殖に重要な遺伝子であると考えられる) を抽出した。図 1 に示すように、BJhTERT では細胞増殖に影響を与えずに、Jurkat 及びに TALL1 で増殖抑制効果を示す shRNA が 10、Jurkat ま

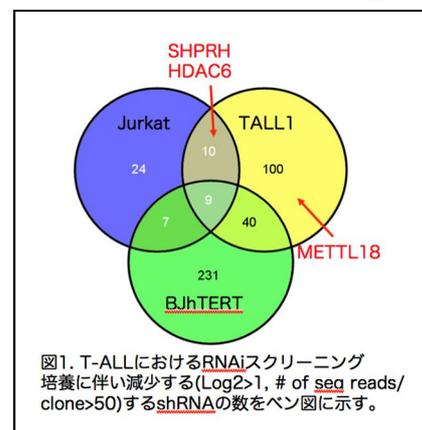


図1. T-ALLにおけるRNAiスクリーニング培養に伴い減少する(Log2>1, # of seq reads/clones>50)するshRNAの数をベン図に示す。

たは T-ALL1 で増殖抑制効果を示す shRNA が 134 同定された。この中から、12 遺伝子に着目し、個別のノックダウンの検証実験、正常細胞と白血病細胞での発現比較を行った。さらに、この結果と低分子化合物を探索する際にリードアウトとなる明らか機能や酵素活性を有するか等を考慮し、最終的に 3 遺伝子 (METTL18、SHPRH、HDAC6) を選択した。

## METTL18

METTL18 は、そのドメイン構造からメチル基転移酵素活性を有すると推測されているが、その機能、特に生物学的な機能は未知である。

RNAi スクリーニングの結果を検証するため、個別のノックダウンベクターを用いて METTL18 ノックダウンの Jurkat、TALL1 及び BJhTERT 細胞の増殖に対する効果を検討し、METTL18 ノックダウンが正常細胞である BJ-hTERT と比較し、選択的に T-ALL 細胞の増殖を抑制する事を見出した。特に、TALL1 細胞の増殖は完全に抑制された (図 1)。更に、図 3 に示す遺伝背景 (有する遺伝子変異の組み合わせ) の異なる 5 種類の T-ALL 細胞株を用いて同様に実験を行い、ノックダウンに対する感受性が METTL18 の発現量と相関する事を見出した (すなわち、METTL18 の高発現する細胞の方が、METTL18 ノックダウンに対して感受性を示す)。さらに、shRNA のオフターゲット効果の可能性を否定するため、Crispr 法により遺伝子破壊株の樹立を行った。METTL18 ノックダウンに対して低感受性である Jurkat では、複数の遺伝子破壊株が樹立でき、破壊株の細胞増殖が親株と比較し有意に低下する事を明らかにした。また、TALL1 細胞では、遺伝子破壊株が樹立できなかった。一方で、METTL18 の発現は健康人では T 細胞系列に局限しており、T-ALL 細胞では発現亢進が認められる事を考慮すると、METTL18 が T-ALL において創薬標的と成り得る可能性を示している。

METTL18 は細胞質に局在し、酵母の遺伝学的な解析からリボソームタンパク質のヒスチジン残基をメチル化すると報告されているが、十分な生化学的解析がなされていないために、METTL18 が真に酵素活性を有するのか? その活性がどのように制御機構されているのか? その基質は何か? 等の効果的な阻害剤開発に必須な情報が不明のままである。これに対して、我々は、Doxycycline (Dox) 誘導性に Flag-HA-METTL18 を発現する細胞株 (Trex-METTL18) (図 4A) を作成し、細胞分画実験を行った。この結果、METTL18 の一部は、これまでの報告通り細胞質に局在 (図 4B) するものの、同程度の METTL18 が核にも存在する事を見出した。この結果は、METTL18 が細胞質のみでなく核タンパク質のメチル化を介して遺伝子制御に働く可能性を示唆しており興味深い。申請時点では、SAM アナログである Propargylic selenium-adenosyl-L-selenomethionine (ProSeAM) を用いた *in vitro* での酵素基質の同定を予定していたが、バキュロウイルスの系での組換え METTL18 タンパク質の作成が進まなかった等の理由から、アフィニティー精製により結合タンパク質を同定し、その中から基質を同定する事とした。この目的のため、上述の Trex-METTL18 細胞から調製し核抽出液から抗 Flag 抗体を用いて Flag-HA-METTL18 と共沈する因子群の同定を行った。しかし、現時点で Flag-HA-METTL18 に特異的なタンパク質は検出されず、METTL18 の結合因子及び基質のアフィニティー精製は困難であった。

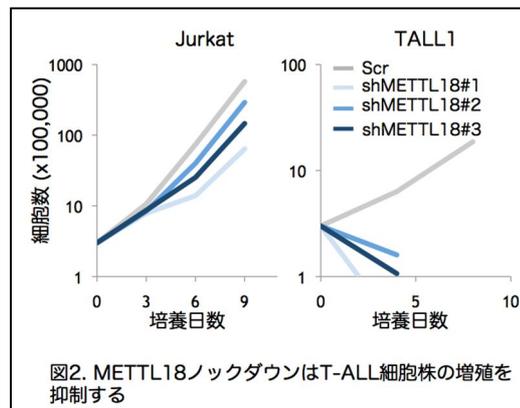


図2. METTL18ノックダウンはT-ALL細胞株の増殖を抑制する

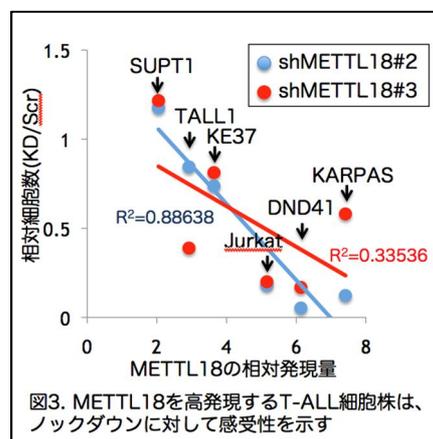


図3. METTL18を高発現するT-ALL細胞株は、ノックダウンに対して感受性を示す

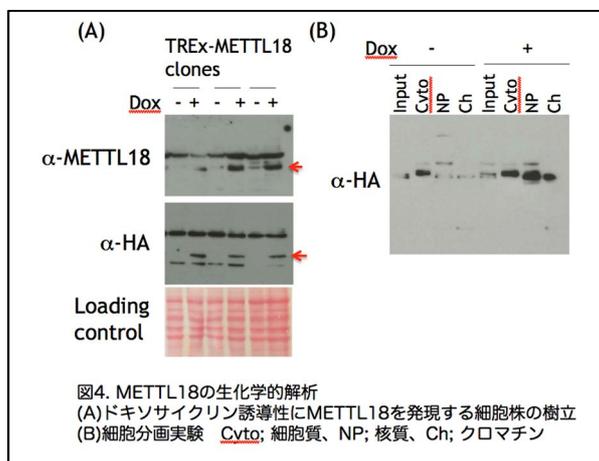


図4. METTL18の生化学的解析 (A)ドキシサイクリン誘導性にMETTL18を発現する細胞株の樹立 (B)細胞分画実験 Cyto: 細胞質、NP; 核質、Ch; クロマチン

## SHPRH、HDAC6

SHPRH は DNA 修復に關与する E3 ubiquitin-protein ligase である。2 種類の異なる shRNA を用いた検証実験の結果、SHPRH ノックダウンは両 T-ALL 細胞株の増殖を同程度に抑制した。一方で、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC6 は Jurkat 細胞の増殖を特異的に抑制し、TALL1 の増殖に影響を与えなかった。

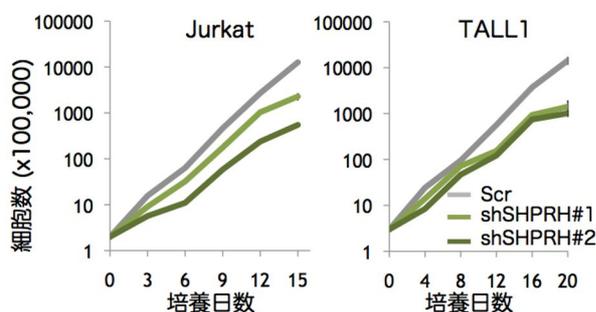


図5. SHPRHノックダウンはT-ALL細胞株の増殖を抑制する

本研究では、T-ALL における創薬標的を同定するため、RNAi スクリーニング及びに検証実験等を行い、METTL18、SHPRH、HDAC6 の3 遺伝子を同定した。特に、METTL18 に関しては、生化学的解析を行い、細胞質のみでなく核にも局在し、核内基質のメチル化を介して遺伝子発現の制御に關与する可能性を見出した。また、酵素活性を指標とした低分子阻害剤開発も可能であると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

1. Miyagi S, Sroczynska P, Kato Y, Nakajima-Takagi Y, Oshima M, Rizq O, Takayama N, Saraya A, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Matsuzaki Y, Christensen J, Helin K, Iwama A. The chromatin binding protein Phf6 restricts the self-renewal of hematopoietic stem cells. *Blood*. pii: blood.2019000468. doi: 10.1182/blood.2019000468. 印刷中、査読あり
2. Tara S, Isshiki Y, Nakajima-Takagi Y, Oshima M, Aoyama K, Tanaka T, Shinoda D, Koide S, Saraya A, Miyagi S, Manabe I, Matsui H, Koseki H, Bardwell VJ, Iwama A. Bcor insufficiency promotes initiation and progression of myelodysplastic syndrome *Blood*. 132, 2470-2483, 2018. doi: 10.1182/blood-2018-01-827964. 査読あり
3. Oshima, M., Hasegawa, N., Mochizuki-Kashio, M., Muto, T., Miyagi, S., Koide, S., Yabata, S., Wendt, G.R., Saraya, A., Wang, C., Shimoda, K., Suzuki, Y., and Iwama, A. Ezh2 regulates the Lin28/let-7 pathway to restrict activation of fetal gene signature in adult hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 44, 282-296, 2016. doi: 10.1016/j.exphem.2015.12.009. 査読あり
4. Koide. S., Oshima, M., Takubo, K., Yamazaki, S., Nitta, E., Saraya, A., Aoyama, K., Kato, Y., Miyagi, S., Nakajima-Takagi, Y., Chiba, T., Matsui, H., Arai, F., Suzuki, Y., Kimura, H., Nakauchi, H., Suda, T., Shinkai, Y., and Iwama, A. Setdb1 maintains hematopoietic stem and progenitor cells by restricting the ectopic activation of nonhematopoietic genes. *Blood*. 128, 638-649, 2016. doi: 10.1182/blood-2016-01-694810. 査読あり
5. Agger, K., Miyagi, S., Pedersen, M.T., Kooistra, S.M., Johansen, J.V., and Helin, K. Jmjd2/Kdm4 demethylases are required for expression of Il3ra and survival of acute myeloid leukemia cells. *Genes Dev*. 30, 1278-1288, 2016. doi: 10.1101/gad.280495.116. 査読あり

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。